

氏 名	喻 平
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	薬学
学位授与番号	博甲第3479号
学位授与の日付	平成19年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	<i>Klebsiella pneumoniae</i> の多剤排出ポンプの遺伝学的・生化学的解析
論文審査委員	教授 土屋 友房      教授 岡本敬の介      准教授 中尾 浩史

### 学位論文内容の要旨

肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* は肺炎の起因菌の1つである。臨床分離された *K. pneumoniae* MGH78578 株は、臨床現場で使われている様々な抗菌剤に対してかなりの程度の耐性を示した。実際、このような肺炎桿菌に感染した場合、抗菌剤による治療が困難であると予想される。肺炎桿菌の多剤耐性機構についてはあまり解析されていないのが現状である。そこで、私は肺炎桿菌の多剤耐性機構を解明すべく、多剤耐性の原因となる遺伝子のクローニング及びその遺伝子産物性質について解析することを目指した。

*K. pneumoniae* MGH78578 株から多剤耐性の原因となる遺伝子を shotgun 法を用いてクローニングした。宿主には大腸菌 (*E. coli*) KAM32 株を用いた。この株は主要な多剤排出ポンプの遺伝子 *acrB*、*ydhE* 及び制限系遺伝子 *hsd* の欠損株である。そのため、各種抗菌剤に高感受性を示し、かつ異種生物の遺伝子のクローニングに適するので、本研究において宿主として用いた。薬剤耐性遺伝子を持つプラスミドを導入された細胞は、宿主が生育できない濃度の各種抗菌薬を含む選択培地で生育できることを指標に選択した。私は得られた候補ハイブリッド・プラスミドのうち、比較的広い範囲の抗菌薬に耐性を付与した pESK32 を用いて解析を進めた。その結果、*K. pneumoniae* では未だ報告されていない遺伝子をクローニングすることに成功した。この遺伝子を *kdeA* と名付けた。

その遺伝子産物である KdeA は、410 アミノ酸残基よりなる疎水性の高いタンパク質であると推定された。既知の膜輸送タンパク質その他の既知タンパク質との相同性・類似性についてデータベースを用いて調べたところ、*E. coli* の多剤排出ポンプ MdfA と類似性を示すことがわかった。KdeA は 12 個の疎水性領域を持ち、この領域で膜を貫通しているものと考えられる。KdeA は報告されている 5 つのファミリーの多剤排出ポンプのうち、MF family に属するものと思われた。大腸菌 KAM32 株に *kdeA* 遺伝子を導入した場合、ethidium bromide、chloramphenicol、norfloxacin、acriflavin、TPPCI、puromycin、daunomycin、ciprofloxacin に対する耐性度が上昇した。この耐性度の上昇が抗菌物質の排出によるものであるかを確認するために ethidium bromide の排出活性を測定したところ、*kdeA* 遺伝子を導入した株の方が、発現していない株よりもかなり排出活性が強いことがわかった。また、この排出はエネルギー依存的であった。このように、抗菌薬に対する耐性度の上昇が排出によるものであることが確認された。これらのことから KdeA は多剤排出ポンプであると結論した。さらに、RT-PCR 法により *K. pneumoniae* MGH78578 株において、抗菌薬が存在しない条件下で培養しても、*kdeA* が転写されていることを示した。

臨床分離株である *K. pneumoniae* MGH78578 株から多剤耐性に関与する遺伝子 *kdeA* をクローニングした。*kdeA* のシーケンスを解析したところ、産物である KdeA は MF family の多剤排出ポンプに高い類似性を示すことがわかった。大腸菌細胞内に *kdeA* を導入すると、構造上類似性のない様々な抗菌剤に対する耐性度が上昇した。また、エネルギー依存的な ethidium bromide の排出活性が確認できた。一方、RT-PCR 法により、*K. pneumoniae* MGH78578 株において薬剤による誘導などがなくとも、*kdeA* が転写されていることが明らかとなった。すなわち、KdeA は *K. pneumoniae* MGH78578 株において構成的に発現され機能している多剤排出ポンプである、この菌の自然耐性に貢献しているものと思われる。

## 論文審査結果の要旨

微生物感染症は人類の最大の死亡原因である。微生物感染症の中では肺炎が、第一位である。*Klebsiella pneumoniae*（肺炎桿菌）は肺炎の主要な原因菌の一つである。近年多くの抗菌薬に耐性を示す多剤耐性 *K. pneumoniae* が増え、臨床現場で大変困った問題となっている。この菌の多剤高度耐性に最も深く関与しているのが多剤排出ポンプである。ゲノム情報から、この菌には三十数個の多剤排出ポンプ遺伝子が存在すると推定されている。それらのほとんどは未解析である。本論文の著者はそれら未解析の多剤排出ポンプの中の一つについて解析を進めた。まず多剤耐性遺伝子をクローニングしそれを *kdeA* と命名した。その産物であるKdeAの性質を詳しく解析した。実際に*kdeA*遺伝子を導入した宿主では各種抗菌物質に対する耐性度が上昇した。またエチジウムの排出活性が確認された。すなわちKdeAが多剤排出ポンプであることが確認された。さらに、RT-PCR法による解析により、*K. pneumoniae*細胞におけるこの遺伝子の発現が確認された。これらのことから、KdeAは実際に*K. pneumoniae*の多剤耐性に関与しているものと考えられた。

以上のように、この論文は *K. pneumoniae* の抗菌薬耐性に関わる一つが多剤排出ポンプのKdeAの遺伝子クローニングと性質の解析を行った大変興味深いものであり、博士（薬学）の学位に値するものと判断した。